

Rec'd PCT/PTO 21 DEC 2004

PCT/JP03/08197

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

27.06.03

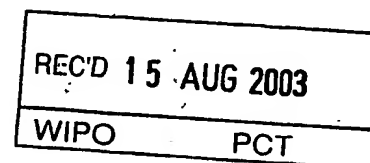
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 6月28日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-191535
[ST. 10/C]: [JP2002-191535]

出 願 人
Applicant(s): キヤノン株式会社

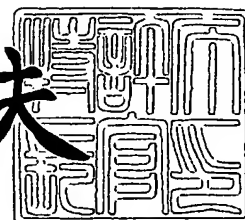


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月31日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 4737033

【提出日】 平成14年 6月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 5/00
G01N 33/50

【発明の名称】 マトリクス援助レーザー脱着／イオン化飛行時間型質量
分析法による基板上の物質の解析方法

【請求項の数】 70

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会
社内

【氏名】 岡本 尚志

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 マトリクス援助レーザー脱着／イオン化飛行時間型質量分析法
による基板上の物質の解析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基板上に固定化されている物質の質量データの取得方法であって、

前記物質の基板上への固定化に、光によって切断される部分構造を含む構造を用い、

基板上に固定化されている物質に対して、前記光によって切断される部分構造の切断を誘起する光を照射し、

該光照射によって前記部分構造が切断され、非固定状態とされた前記物質の質量スペクトルを分析することを特徴とする基板上に固定化されている物質の質量データの取得方法。

【請求項 2】 前記質量スペクトルを分析する手段がマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry、以下MALDI-TOF MSと略す) 法である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記光によって切断される部分構造の切断を誘起する光が、前記MALDI-TOF MS法の分析時に使用されるレーザー光であることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記MALDI-TOF MS法の分析時に使用されるレーザー光は、
波長 337 nm の窒素レーザー光であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 前記基板上に固定化されている物質が、核酸であることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】 核酸が、DNAであることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

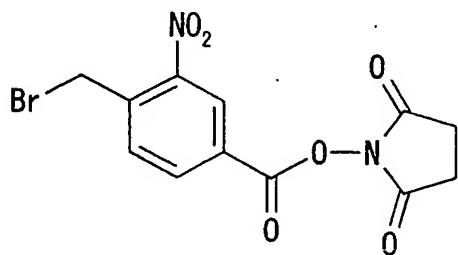
【請求項 7】 核酸が、RNAであることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】 核酸が、PNA（ペプチド核酸）であることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】 光照射によって切断される部分構造として、ニトロベンゼンを含む構造を選択することを特徴とする請求項 1～8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】 前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物 I を用いて構築されていることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【化 1】

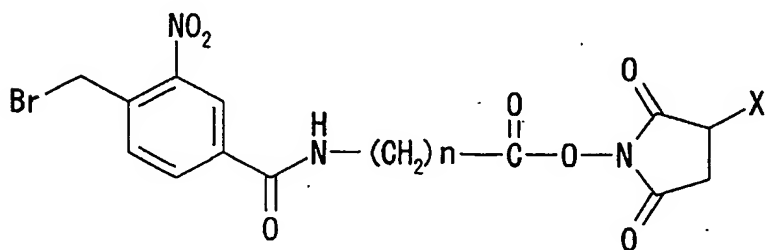


化合物 I

化合物 I

【請求項 11】 前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物 I I を用いて構築されていることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【化 2】



一般式 I I

(式中、 $n = 3$ 、または、 4 、 $X = H$ 、または、 SO_3Na である)

【請求項 12】 前記基板は、表面に 1 級アミノ基が形成されたガラス基板であり、

前記物質の末端にチオール (SH) 基が結合されており、

該アミノ基と、該チオール基との結合が、前記化合物 I、あるいは、一般式 I で示される化合物を介して、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応、及び、チオール基とこれら化合物のブロムベンジル部位との反応によって行われていることを特徴とする請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】 前記ガラス基板への 1 級アミノ基の形成が、1 級アミノ基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】 前記基板は、表面にスルファニル基が形成されたガラス基板であり、

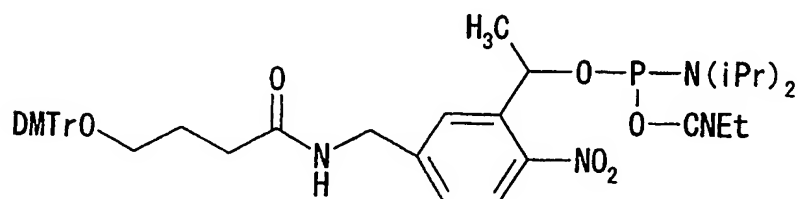
前記物質の末端にアミノ基が結合されており、

該チオール基と、該アミノ基の結合が、化合物 I、あるいは、一般式 II で示される化合物を介して、チオール基とこれら化合物の部ブロムベンジル部位との反応、及び、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応によって行われていることを特徴とする請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 15】 前記ガラス基板へのチオール基の形成が、チオール基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】 前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の一般式 III で示される化合物を用いて構築されていることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【化 3】



化合物 III

(式中、DMTrOは、ジメトキシトリチルオキシ基、CNEtは、2-シアノエチル基を表す。)

【請求項 17】 基板上に固定化されている物質の脱離、及び、イオン化を支援する物質（マトリクス物質）を、上記基板の、すくなくとも、質量分析を行う領域にコーティングする請求項 2～16 に記載の得方法。

【請求項 18】 マトリクス物質のコーティングの厚さが、基板上に固定化されている物質の脱離、及び、イオン化に必要にして十分である請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】 複数の生体関連物質が光によって切断される部分構造を含む構造によって基板上にマトリクス状に固定配置されたバイオチップの各マトリクスの生体関連物質の質量データの取得方法であって、

基板上に固定化されている各マトリクスの生体関連物質に対して、前記光によって切断される部分構造の切断を誘起する光を照射し、

該光照射によって前記部分構造が切断され、非固定状態とされた前記生体関連物質の質量スペクトルを分析することを特徴とするバイオチップの各マトリクスの生体関連物質の質量データの取得方法。

【請求項 20】 前記質量スペクトルを分析する手段がMALDI-TOF MS法である請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】 前記光によって切断される部分構造の切断を誘起する光が、前記MALDI-TOF MS法の分析時に使用されるレーザー光であることを特徴とする請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】 前記MALDI-TOF MS法の分析時に使用されるレーザー光は、波長 337 nm の窒素レーザー光であることを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】 前記基板上に固定化されている生体関連物質が、核酸であることを特徴とする請求項 19～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】 核酸が、DNAであることを特徴とする請求項 23 に記載の方法。

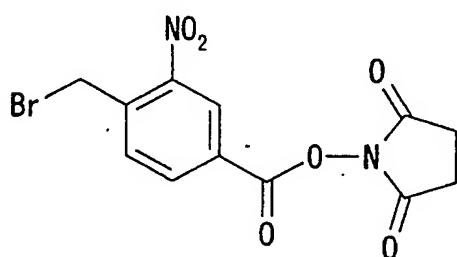
【請求項 25】 核酸が、RNAであることを特徴とする請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】 核酸が、PNA（ペプチド核酸）であることを特徴とする請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】 光照射によって切断される部分構造として、ニトロベンゼンを含む構造を選択することを特徴とする請求 19～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】 前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物 I を用いて構築されていることを特徴とする請求項 27 に記載の方法。

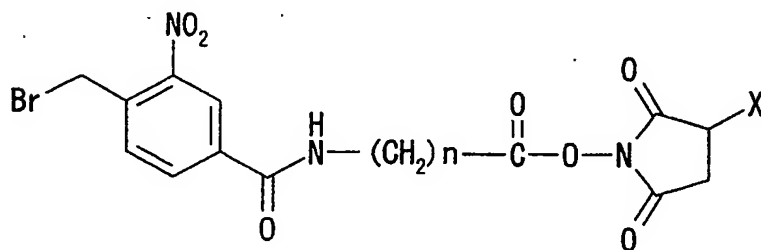
【化 4】



化合物 I

【請求項 29】 前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物 II を用いて構築されていることを特徴とする請求項 27 に記載の方法。

【化 5】



一般式 II

(式中、 $n = 3$ 、または、 4 、 $X = H$ 、または、 SO_3Na である)

【請求項 30】 前記基板は、表面に 1 級アミノ基が形成されたガラス基板であり、

前記生体関連物質の末端にチオール (SH) 基が結合されており、

該アミノ基と、該チオール基との結合が、前記化合物 I、あるいは、一般式 II で示される化合物を介して、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル

部位との反応、及び、チオール基とこれら化合物のブロムベンジル部位との反応によって行われていることを特徴とする請求項 28 または 29 に記載の方法。

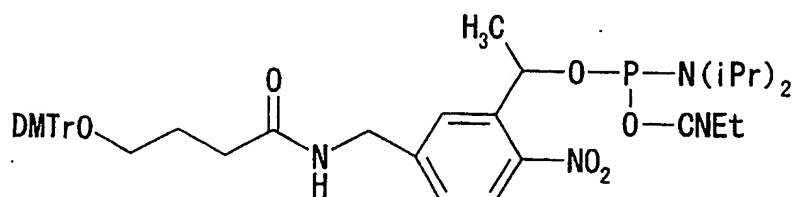
【請求項 31】 前記ガラス基板への 1 級アミノ基の形成が、1 級アミノ基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることを特徴とする請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】 前記基板は、表面にチオール基が形成されたガラス基板であり、
前記生体関連物質の末端にアミノ基が結合されており、
該チオール基と、該アミノ基の結合が、化合物 I、あるいは、一般式 I I で示される化合物を介して、チオール基とこれら化合物の部ブロムベンジル部位との反応、及び、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応によって行われていることを特徴とする請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 33】 前記ガラス基板へのチオール基の形成が、チオール基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】 前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の一般式 I I I で示される化合物を用いて構築されていることを特徴とする請求項 27 に記載の方法。

【化 6】



化合物 I I I

(式中、DMTrO は、ジメトキシトリチルオキシ基、CNEt は、2-シアノエチル基を表す。)

【請求項 35】

基板上に固定化されている生体関連物質の脱離、及び、イオン化を支援するマトリクス物質を、上記基板の、すくなくとも、質量分析を行う領域にコーティン

グする請求項 19～34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記マトリクス物質のコーティングの厚さが、基板上に固定化されている生体関連物質の脱離、及び、イオン化に必要なにして十分である請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】 複数の生体関連物質が基板上にマトリクス状に固定配置されたバイオチップであって、
各マトリクス上の生体関連物質が、光によって切断される部分構造によって固定されていることを特徴とするバイオチップ。

【請求項 38】 前記光によって切断される部分構造の切断を誘起する光が、レーザー光であることを特徴とする請求項 37 に記載のバイオチップ。

【請求項 39】 前記レーザー光が、波長 337 nm の窒素レーザー光であることを特徴とする請求項 38 に記載のバイオチップ。

【請求項 40】 前記基板上に固定化されている生体関連物質が、核酸であることを特徴とする請求項 37～39 のいずれか一項に記載のバイオチップ。

【請求項 41】 核酸が、DNA であることを特徴とする請求項 40 に記載のバイオチップ。

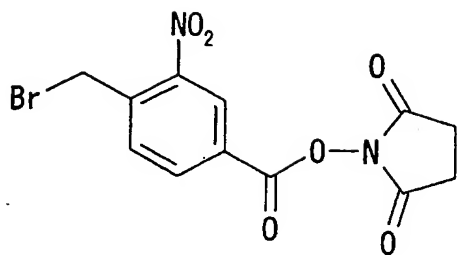
【請求項 42】 核酸が、RNA であることを特徴とする請求項 41 に記載のバイオチップ。

【請求項 43】 核酸が、PNA（ペプチド核酸）であることを特徴とする請求項 42 に記載のバイオチップ。

【請求項 44】 光照射によって切断される部分構造として、
ニトロベンゼンを含む構造を有することを特徴とする請求項 37～43 のいずれか一項に記載のバイオチップ。

【請求項 45】 前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物 I を用いて構築されていることを特徴とする請求項 44 に記載のバイオチップ。

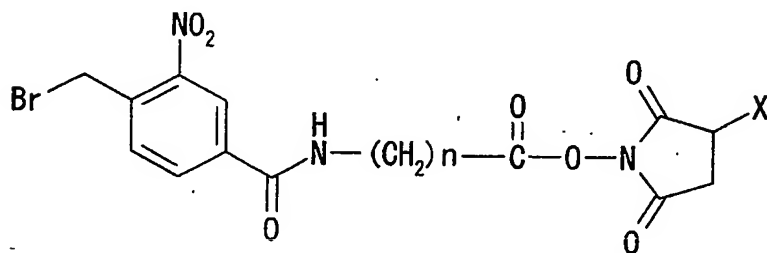
【化 7】



化合物 I

【請求項 4 6】 前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物 I I を用いて構築されていることを特徴とする請求項 4 4 のバイオチップ。

【化 8】



一般式 I I

(式中、 $n = 3$ 、または、 4 、 $X = H$ 、または、 SO_3Na である)

【請求項 4 7】 前記基板は、表面に 1 級アミノ基が形成されたガラス基板であり、

前記生体関連物質の末端にチオール (SH) 基が結合されており、

該アミノ基と、該チオール基との結合が、前記化合物 I、あるいは、一般式 I I で示される化合物を介して、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応、及び、チオール基とこれら化合物のブロムベンジル部位との反応によって行われていることを特徴とする請求項 4 5 または 4 6 に記載のバイオチップ。

【請求項 4 8】 前記ガラス基板への 1 級アミノ基の形成が、1 級アミノ基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることを特徴とする請求項 4 7 に記載のバイオチップ。

【請求項 4 9】 前記基板は、表面にチオール基が形成されたガラス基板で

あり、

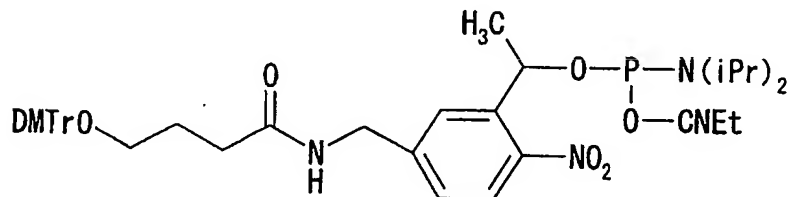
前記生体関連物質の末端にアミノ基が結合されており、

該チオール基と、該アミノ基の結合が、化合物 I、あるいは、一般式 I I で示される化合物を介して、チオール基とこれら化合物の部ブロムベンジル部位との反応、及び、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応によって行われていることを特徴とする請求項 45 または 46 に記載のバイオチップ。

【請求項 50】 前記ガラス基板へのチオール基の形成が、チオール基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることを特徴とする請求項 49 に記載のバイオチップ。

【請求項 51】 前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の一般式 I I I で示される化合物を用いて構築されていることを特徴とする請求項 44 に記載のバイオチップ。

【化 9】



化合物 I I I

(式中、DMTrO は、ジメトキシトリチルオキシ基、CNEt は、2-シアノエチル基を表す。)

【請求項 52】 複数の生体関連物質が基板上にマトリクス状に固定配置されたバイオチップの各マトリクスの生体関連物質、及び、該生体関連物質と相互作用する物質の質量データの取得方法であって、

各マトリクス上の生体関連物質は、光によって切断される部分構造を含む構造によって前記基板に固定化されており、

バイオチップの各マトリクスの生体関連物質と相互作用する物質を該相互作用可能な条件におき、

基板上に固定化されている生体関連物質に対して、前記光によって切断される部分構造の切断を誘起する光を照射し、

該光照射によって前記部分構造が切断され、非固定状態とされた前記生体関連物質と、同時に非固定状態とされた該生体関連物質と相互作用した物質の質量スペクトルを分析することを特徴とするバイオチップの各マトリクスの生体関連物質、及び、該生体関連物質と相互作用する物質の質量データの取得方法。

【請求項 53】 質量スペクトルを分析する手段がMALDI-TOF MS法である請求項 52 に記載の方法方法。

【請求項 54】 前記光によって切断される部分構造の切断を誘起する光が、前記MALDI-TOF MS法の分析時に使用されるレーザー光であることを特徴とする請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】 前記MALDI-TOF MS法の分析時に使用されるレーザー光は、波長 337 nm の窒素レーザー光であることを特徴とする請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】 前記基板上に固定化されている生体関連物質が、核酸であり、前記相互作用が該核酸と該核酸の一部の塩基配列と相補的な塩基配列をその一部に有する核酸とのハイブリダイゼーションであることを特徴とする請求項 52 ～ 55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】 核酸が、DNAであることを特徴とする請求項 56 に記載の方法。

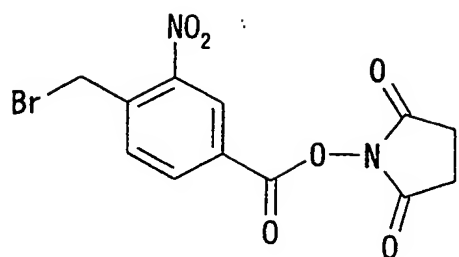
【請求項 58】 核酸が、RNAであることを特徴とする請求項 56 に記載の方法。

【請求項 59】 核酸が、PNA（ペプチド核酸）であることを特徴とする請求項 56 に記載の方法。

【請求項 60】 光照射によって切断される部分構造として、ニトロベンゼンを含む構造を選択することを特徴とする請求項 52 ～ 59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】 前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物 I を用いて構築されていることを特徴とする請求項 60 に記載の方法。

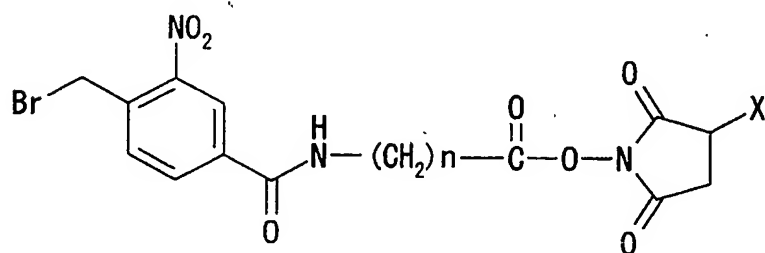
【化10】



化合物 I

【請求項 62】 前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物 I I を用いて構築されていることを特徴とする請求項 60 に記載の方法。

【化11】



一般式 I I

(式中、 $n = 3$ 、または、 4 、 $X = H$ 、または、 SO_3Na である)

【請求項 63】 前記基板は、表面に 1 級アミノ基が形成されたガラス基板であり、

前記生体関連物質の末端にチオール (SH) 基が結合されており、

該アミノ基と、該チオール基との結合が、前記化合物 I、あるいは、一般式 I I で示される化合物を介して、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応、及び、チオール基とこれら化合物のブロムベンジル部位との反応によって行われていることを特徴とする請求項 61 または 62 に記載の方法。

【請求項 64】 前記ガラス基板への 1 級アミノ基の形成が、1 級アミノ基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることを特徴とする請求項 63 に記載の方法。

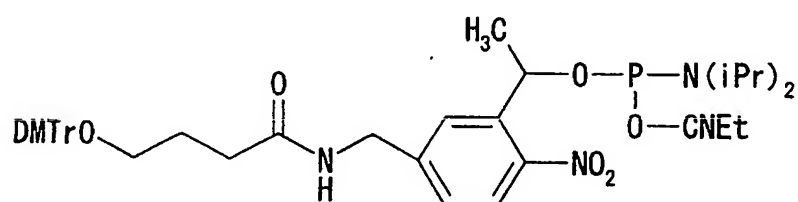
【請求項 65】 前記基板は、表面にチオール基が形成されたガラス基板であり、

前記生体関連物質の末端にアミノ基が結合されており、
該チオール基と、該アミノ基の結合が、化合物 I、あるいは、一般式 I I で示される化合物を介して、チオール基とこれら化合物の部ブロムベンジル部位との反応、及び、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応によって行われていることを特徴とする請求項 5 4 または 5 5 に記載の方法。

【請求項 6 6】 前記ガラス基板へのチオール基の形成が、チオール基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることを特徴とする請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 7】 前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の一般式 I I I で示される化合物を用いて構築されていることを特徴とする請求項 6 6 に記載の方法。

【化 1 2】



化合物 I I I

(式中、DMTrOは、ジメトキシトリチルオキシ基、CNEtは、2-シアノエチル基を表す。)

【請求項 6 8】 基板上に固定化されている生体関連物質と、該生体関連物質と相互作用した物質の脱離、及び、イオン化を支援するマトリクス物質を、上記基板の、すくなくとも、質量分析を行う領域にコーティングする請求項 5 2 ～ 6 7 いずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 9】 前記マトリクス物質の厚さが、基板上に固定化されている生体関連物質と、該生体関連物質と相互作用した物質の脱離、及び、イオン化に必要なして十分である請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】 生体関連物質が光によって切断される構造で固定されたバイオチップを、所定位置から分析可能な位置まで移動搬送する手段と、該分析可能な位置に於いて、該バイオチップの形状と、バイオチップ上の各マトリクスの

配置情報に基づいて、指定した順に従って、各マトリクス上の物質を順次分析し、バイオチップを分析可能な位置から所定の位置まで移動搬送する手段を具備したことを特徴とするMALDI-TOF MS装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

【0002】

【発明の詳細な説明】

【0003】

【発明の属する技術分野】

本発明は、基板上に固定化されている物質の解析方法に関し、より具体的には、複数の生体関連物質がマトリクス状に固定配置されている、所謂、バイオチップに対して、その生体関連物質に関して解析する方法、ならびに、生体関連物質の固定が該解析方法の適用に適する形態とされているバイオチップ、さらには、前記バイオチップ上に固定されている生体関連物質と相互作用する物質の解析方法に関する。

【0004】

【従来の技術】

基板に特定の物質が固定化されてなるデバイス、なかでも、複数の生体関連物質がマトリクス状に固定配置されている、DNAチップ、プロテインチップ等、各種のプロープ分子を基板上にマトリクス状に配置したもの、所謂、バイオチップは、ゲノム解析、あるいは、遺伝子の発現解析などの目的に利用されるようになってきた。また、それらバイオチップを利用した解析の結果は、癌、遺伝病、生活習慣病、感染症等の診断、予後予想、治療方針の決定等に重要な指標を提供するものと期待されている。

【0005】

バイオチップの作製方法には、幾つかの手法が知られている。DNAチップを例にとって説明すると、フォトリソグラフィーを用いて、直接基板上にDNAプロープを逐次的に合成していく方法（米国特許第5405783公報等）、ある

いは、予め合成したDNA、または、cDNA（コンプリメンタリーDNA）を、基板上に供給し結合する方法（米国特許第5601980公報、特開平11-187900号公報、Science Vol. 270, 467, 1995等）が代表的なDNAチップの作製法である。

【0006】

一般的には、前記の方法のいずれかによってバイオチップが作製されるが、いずれの方法によって作製されるとしても、これらのバイオチップを先に述べた用途に使用しようとする場合、解析の信頼性を保証するためには各マトリクスに存在するプローブ、すなわち、この場合では生体関連物質が、所望する物質であることが極めて重要である。仮に、バイオチップの各マトリクスに存在する物質の極く一部であっても、所望の物質でない場合、その不純物がプローブ分子として機能する結果も混入することになり、解析の信頼性は根本的に失われるからである。

【0007】

しかしながら、例えば、先に示したDNAチップの作製方法をはじめとして、通常のバイオチップの作製方法では、所望としない物質が、特定の位置に固定配置される可能性が完全に排除されているとは、必ずしもいいきれないにもかかわらず、一旦基板上に固定配置された物質を特定する方法はこれまでほとんど知られていなかった。（なお、ここでいう固定とは、例えば、共有結合のように、基板上に強固に結合している状態をいい、単に吸着のような状態ではない。）

例えば、高感度な表面分析技術として知られる、飛行時間型二次イオン質量分析（Time of Flight type Secondary Ion Mass Spectrometry 以下TOF-SIMS）を用いると、例えば、金基板上に単分子膜レベルで形成されたオリゴヌクレオチドを分析することが可能である（Proceeding of the 12th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry 951, 1999）。しかし、検出される二次イオンは、固定配置された物質が分断化された、例えば、 P^- 、 PO^- 、 PO_2^- 、または PO_3^- 等のフラグメントイオンであり、これらの断片的な情報

からは、元の物質がどのようなオリゴヌクレオチド、すなわち、この場合には、どのような塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであるかを知ることはできない。別のフラグメントイオンとしては、(アデニン-H)⁻、(チミン-H)⁻、(グアニン-H)⁻、(シトシン-H)⁻、(ウラシル-H)⁻等の塩基のフラグメントイオンも検出されるが、組成、例えば、全体の塩基配列を確実に特定できるほどの定量性、厳密性は、TOF-SIMSにはない。

【0008】

他の高感度な表面分析方法としては、X線電子分光法 (X-ray Photoelectron Spectrometry：以下XPS) があるが、この方法によって得られる情報も原子の組成、もしくは、原子間の結合状態に関するものであり、物質全体に関する情報を得ることはできず、感度的にも、例えば、単分子膜レベルの核酸を分析するためには十分とはいえない。

【0009】

一方、基板上に、例えば吸着している物質の分析に関していえば、近年、マトリクス援助レーザー脱着／イオン化飛行時間型質量分析 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry：以下MALDI-TOF MS) 法が、物質の分子量を高感度に分析可能な方法として注目されている。

【0010】

MALDI-TOF MS法とは、マトリクスとよばれる、特定の波長の光を吸収する物質と、被検物質を混合して、分析用の、例えば、ステンレス基板上に置き (吸着)、ここにマトリクスが吸収する光を照射して、マトリクスから被検物質へのエネルギー移動により、被検物質を、脱着、イオン化させる。この脱着イオンを、飛行時間的に質量分析するのがMALDI-TOF MS法の基本原理である。前述のTOF-SIMS法では、一次イオン照射で発生するフラグメントイオンを分析するが、このMALDI-TOF MS法においては、フラグメント化していない物質そのものに関しても、その質量を分析することが可能である。従って、例えば、対象が核酸であれば、塩基配列自体を分析することはで

きないものの、塩基配列に関する極めて重要なデータを得ることができることになる。少なくとも、フラグメント化していない核酸について測定される質量が、意図した値と異なれば、その核酸は所望の塩基配列を有するものではないことは、瞭然である。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、MALDI-TOF MS法では、測定対象の物質を断片化せず、そのまま脱着させる原理を有するので、基板上に、例えば、共有結合によって固定された物質は、そのままでは、脱着イオン化を行うことができず、従って分析できない。すなわち、上述のバイオチップにおいて、各マトリクスに固定配置された物質は、そのままでは、MALDI-TOF MS法による分析が適用できないことになる。

【0012】

このようなMALDI-TOF MS法の持つ課題を解決する手段として、例えば、核酸チップを用いて遺伝子多形を分析する際に、プローブ核酸の特定の位置に、酸性で分解可能な結合を配し、マトリクスと共に酸性物質を混入させることにより、分析時に、プローブ核酸を切断、イオン化することにより、プローブ核酸を分析する方法が示されている (Nucleic Acid Research, Vol. 29, No. 18, 3864, 2001)。この方法によれば、基板に共有結合で固定化されている核酸の分析も可能ではあるが、この方法には、上記文献にも記述があるように、核酸 (DNA、RNA) は酸性条件でデピュリネーションを起こして、プリン塩基の場所で切断されてしまうので、酸性条件を強くできないため、上記意図した特定の場所での切断効率が悪く、その分、分析の感度が低いという問題点、逆にいえば、感度を上げようとして、酸性条件を強くすると、核酸が上記特定の位置以外の場所で切断されてしまうという問題点がある。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記従来技術の持つ課題を検討した結果、以下の発明を為すに至った。

【0014】

すなわち、本発明にかかる基板上に固定化されている物質の解析方法は、
基板上に固定化されている物質を解析する方法であって、
前記物質の基板上への固定化に、光によって切断される部分構造を含む構造を
選択し、

基板上に固定化されている物質に対して、前記光によって切断される部分構造
の切断を誘起する光を照射し、

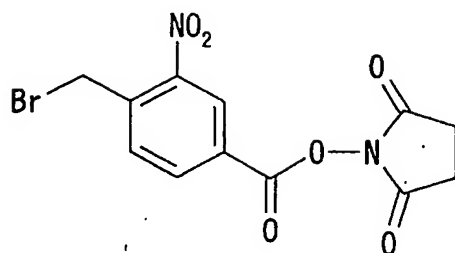
該光照射によって前記部分構造が切断され、非固定状態とされた前記物質の質
量スペクトルを分析する質量データの取得方法である。質量スペクトルの分析方
法としてはマトリクス援助レーザー脱着／イオン化飛行時間型質量分析 (Mat
rix-Assisted Laser Desorption/Ioniza
tion Time-of-Flight Mass Spectrometr
y:以下MALDI-TOF MS) 法を用いることが好ましい。その際、前記
光によって切断される部分構造の切断を誘起する光が、前記MALDI-TOF
MS法の分析時に使用されるレーザー光であることが好ましい。また、前記M
ALDI-TOF MS法の分析時に使用されるレーザー光は、波長337nm
の窒素レーザー光であることができる。例えば、前記基板上に固定化されている
物質が、核酸であることが好ましい。その核酸としては、DNA、RNA、PNA
(ペプチド核酸) のいずれでもよい。

【0015】

光照射によって切断される部分構造として、ニトロベンゼンを含む構造を選択
することが好ましい。前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物Iを用い
て構築されていることができる。

【0016】

【化13】



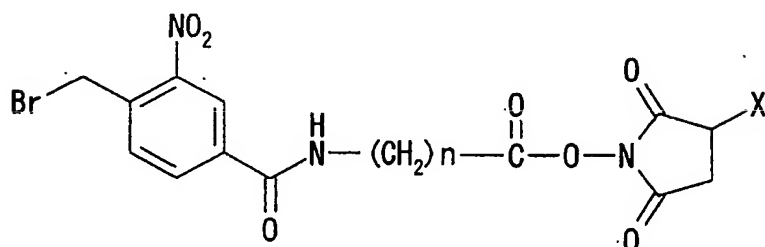
【0017】

化合物 I

また、前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物IIを用いて構築されていることもできる。

【0018】

【化14】



【0019】

一般式II

(式中、 $n=3$ 、または、 4 、 $X=H$ 、または、 SO_3Na である)

加えて、その際、前記基板は、表面に1級アミノ基が形成されたガラス基板であり、

前記物質の末端にスルファニル (SH) 基が結合されており、

該アミノ基と、該スルファニル基との結合が、前記化合物 I、あるいは、一般式IIで示される化合物を介して、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応、及び、スルファニル基とこれら化合物のブロムベンジル部位との反応によって行われていることが好ましい。なお、前記ガラス基板への1級アミノ基の形成が、1級アミノ基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることが好ましい。

【 0 0 2 0 】

あるいは、前記基板は、表面にスルファニル基が形成されたガラス基板であり

前記物質の末端にアミノ基が結合されており、

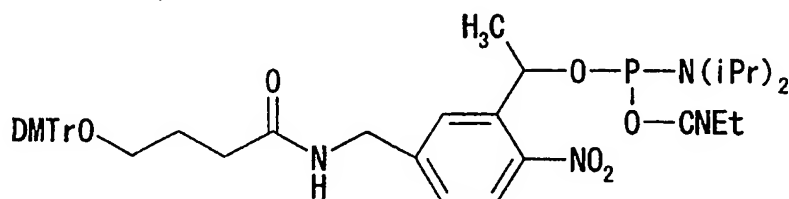
該スルファニル基と、該アミノ基の結合が、化合物I、あるいは、一般式IIで示される化合物を介して、スルファニル基とこれら化合物の部ブロムベンジル部位との反応、及び、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応によって行われていることもできる。その時、前記ガラス基板へのスルファニル基の形成が、スルファニル基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることが好ましい。

【 0 0 2 1 】

さらには、前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の一般式IIIで示される化合物を用いて構築されていることもよい。

【0 0 2 2】

【化 1 5】



【 0 0 2 3 】

化合物III

(式中、DMTr Oは、ジメトキシトリチルオキシ基、CNE_tは、2-シアノエチル基を表す。)

加えて、本発明にかかるバイオチップの解析方法は、
複数の生体関連物質が基板上にマトリクス状に固定配置されたバイオチップの解析法であって、

各マトリクス上への生体関連物質の固定化に、光によって切断される部分構造を含む構造を選択し、

基板上に固定化されている生体関連物質に対して、前記光によって切断される

部分構造の切断を誘起する光を照射し、

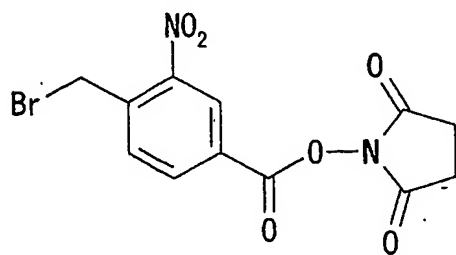
該光照射によって前記部分構造が切断され、非固定状態とされた前記生体関連物質を、マトリクス援助レーザー脱着／イオン化飛行時間型質量分析法によって分析することを特徴とするバイオチップの解析方法である。その際、前記光によって切断される部分構造の切断を誘起する光が、前記MALDI-TOF MS法の分析時に使用されるレーザー光であることが好ましい。また、前記MALDI-TOF MS法の分析時に使用されるレーザー光は、波長337 nmの窒素レーザー光であることができる。例えば、前記基板上に固定化されている生体関連物質が、核酸であることが好ましい。その核酸としては、DNA、RNA、PNA（ペプチド核酸）のいずれでもよい。

【0024】

光照射によって切断される部分構造として、ニトロベンゼンを含む構造を選択することが好ましい。前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物Iを用いて構築されていることができる。

【0025】

【化16】



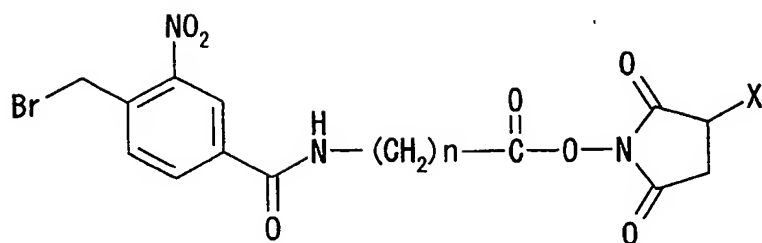
【0026】

化合物I

また、前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物IIを用いて構築されていることもできる。

【0027】

【化17】



【0028】

一般式II

(式中、 $n = 3$ 、または、 4 、 $X = H$ 、または、 SO_3Na である)

加えて、その際、前記基板は、表面に1級アミノ基が形成されたガラス基板であり、

前記物質の末端にスルファニル (SH) 基が結合されており、

該アミノ基と、該スルファニル基との結合が、前記化合物 I、あるいは、一般式IIで示される化合物を介して、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応、及び、スルファニル基とこれら化合物のブロムベンジル部位との反応によって行われていることが好ましい。なお、前記ガラス基板への1級アミノ基の形成が、1級アミノ基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることが好ましい。

【0029】

あるいは、前記基板は、表面にスルファニル基が形成されたガラス基板であり、

前記物質の末端にアミノ基が結合されており、

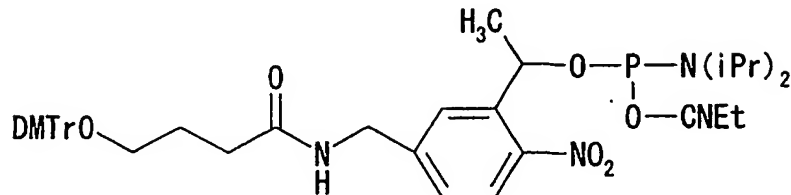
該スルファニル基と、該アミノ基の結合が、化合物 I、あるいは、一般式IIで示される化合物を介して、スルファニル基とこれら化合物の部ブロムベンジル部位との反応、及び、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応によって行われていることもできる。その時、前記ガラス基板へのスルファニル基の形成が、スルファニル基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることが好ましい。

【0030】

さらには、前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の一般式IIIで示される化合物を用いて構築されていることもよい。

【0031】

【化18】



【0032】

化合物III

(式中、DMTrOは、ジメトキシトリチルオキシ基、CNEtは、2-シアノエチル基を表す。)

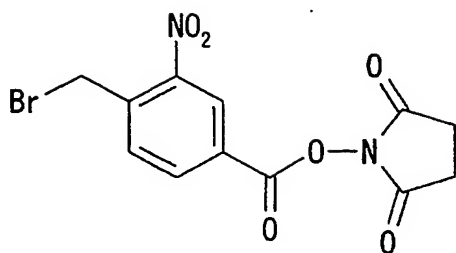
一方、本発明のバイオチップは、複数の生体関連物質が基板上にマトリクス状に固定配置されたバイオチップであって、各マトリクス上への生体関連物質の固定化に、光によって切断される部分構造を含む構造が選択されていることを特徴とするバイオチップである。前記光によって切断される部分構造の切断を誘起する光が、レーザー光である、その際、前記レーザー光が、波長337nmの窒素レーザー光であることが好ましい。例えば、前記基板上に固定化されている生体関連物質が、核酸であることが好ましい。その核酸としては、DNA、RNA、PNA（ペプチド核酸）のいずれでもよい。

【0033】

光照射によって切断される部分構造として、ニトロベンゼンを含む構造を選択することが好ましい。前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物Iを用いて構築されていることができる。

【0034】

【化19】



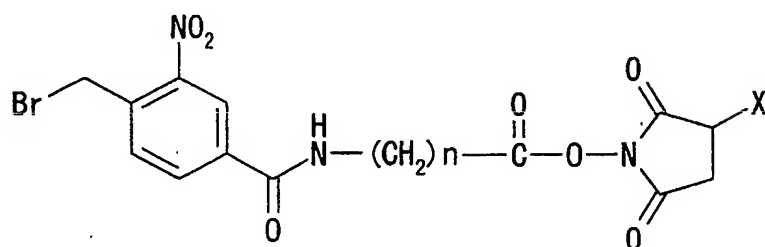
【0035】

化合物 I

また、前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物IIを用いて構築されていることもできる。

【0036】

【化20】



【0037】

一般式II

(式中、 $n = 3$ 、または、 4 、 $X = H$ 、または、 SO_3Na である)

加えて、その際、前記基板は、表面に1級アミノ基が形成されたガラス基板であり、

前記物質の末端にスルファニル (SH) 基が結合されており、

該アミノ基と、該スルファニル基との結合が、前記化合物 I、あるいは、一般式IIで示される化合物を介して、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応、及び、スルファニル基とこれら化合物のブロムベンジル部位との反応によって行われていることが好ましい。なお、前記ガラス基板への1級アミノ基の形成が、1級アミノ基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることが好ましい。

【0038】

あるいは、前記基板は、表面にスルファニル基が形成されたガラス基板であり、

前記物質の末端にアミノ基が結合されており、

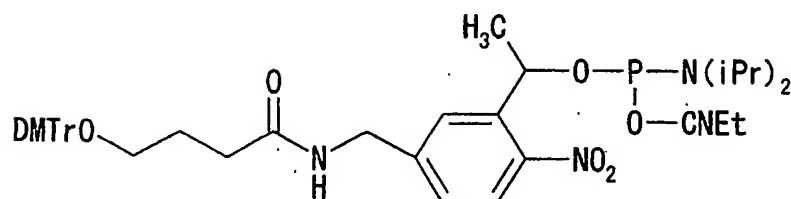
該スルファニル基と、該アミノ基の結合が、化合物I、あるいは、一般式IIで示される化合物を介して、スルファニル基とこれら化合物の部プロムベンジル部位との反応、及び、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応によって行われていることもできる。その時、前記ガラス基板へのスルファニル基の形成が、スルファニル基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることが好ましい。

【0039】

さらには、前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の一般式IIIで示される化合物を用いて構築されていることもよい。

【0040】

【化21】



【0041】

化合物III

(式中、DMTrOは、ジメトキシトリチルオキシ基、CNEtは、2-シアノエチル基を表す。)

対応して、本発明にかかるバイオチップの解析方法は、

複数の生体関連物質が基板上にマトリクス状に固定配置されたバイオチップの解析法であって、

バイオチップの各マトリクスの生体関連物質と相互作用する物質を該相互作用可能な条件におき、

各マトリクス上への生体関連物質の固定化に、光によって切断される部分構造を

含む構造を選択し、

基板上に固定化されている生体関連物質に対して、前記光によって切断される部分構造の切断を誘起する光を照射し、

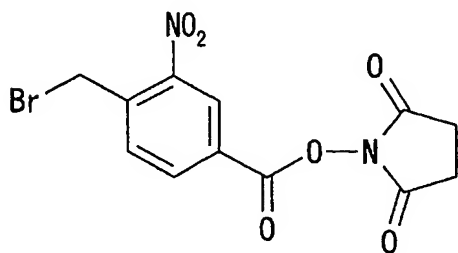
該光照射によって前記部分構造が切断され、非固定状態とされた前記生体関連物質と、該生体関連物質と相互作用した物質とを、同時に、マトリクス援助レーザー脱着／イオン化飛行時間型質量分析法によって分析することを特徴とするバイオチップの解析方法である。その際、前記光によって切断される部分構造の切断を誘起する光が、前記MALDI-TOF MS法の分析時に使用されるレーザー光であることが好ましい。なお、前記MALDI-TOF MS法の分析時に使用されるレーザー光は、波長337nmの窒素レーザー光であることができる。例えば、前記基板上に固定化されている生体関連物質が、核酸であることが好ましい。その核酸としては、DNA、RNA、PNA（ペプチド核酸）のいずれでもよい。

【0042】

光照射によって切断される部分構造として、ニトロベンゼンを含む構造を選択することが好ましい。前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物Iを用いて構築されていることができる。

【0043】

【化22】



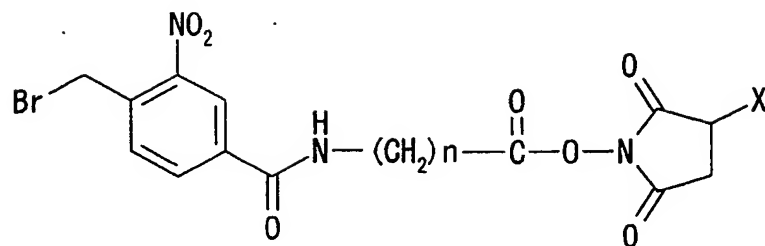
【0044】

化合物 I

また、前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物IIを用いて構築されていることもできる。

【0045】

【化 2 3】



【0046】

一般式II

(式中、 $n = 3$ 、または、 4 、 $X = H$ 、または、 SO_3Na である)

加えて、その際、前記基板は、表面に1級アミノ基が形成されたガラス基板であり、

前記物質の末端にスルファニル (SH) 基が結合されており、

該アミノ基と、該スルファニル基との結合が、前記化合物 I、あるいは、一般式IIで示される化合物を介して、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応、及び、スルファニル基とこれら化合物のブロムベンジル部位との反応によって行われていることが好ましい。なお、前記ガラス基板への1級アミノ基の形成が、1級アミノ基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることが好ましい。

【0047】

あるいは、前記基板は、表面にスルファニル基が形成されたガラス基板であり、

前記物質の末端にアミノ基が結合されており、

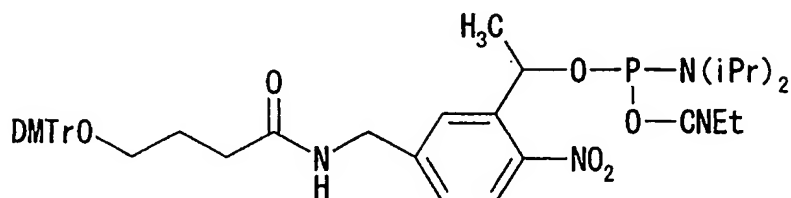
該スルファニル基と、該アミノ基の結合が、化合物 I、あるいは、一般式IIで示される化合物を介して、スルファニル基とこれら化合物の部ブロムベンジル部位との反応、及び、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応によって行われていることもできる。その時、前記ガラス基板へのスルファニル基の形成が、スルファニル基を有するシランカップリング剤を用いて行われていることが好ましい。

【0048】

さらには、前記ニトロベンゼンを含む構造は、下記の一般式IIIで示される化合物を用いて構築されていることもよい。

【0049】

【化24】



【0050】

化合物III

(式中、DMTrOは、ジメトキシトリチルオキシ基、CNEtは、2-シアノエチル基を表す。)

【0051】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明をより詳しく説明する。

【0052】

すなわち、本発明は、光によって切断される部分構造を含む構造で基板上に固定化されている物質に、該切断される部分構造が切断される光を照射し、該光照射によって切断された上記物質をMALDI-TOF MS法によって分析することを特長とする。この際、基板は、複数の生体関連物質がマトリクス状に固定配置された、いわゆる、バイオチップであることが本発明の主眼目であるが、無論、本発明はバイオチップに限定されるものではない。

【0053】

また、本発明は、MALDI-TOF MS法を用いて、生体関連物質を分析可能とするべく、光によって切断される部分構造を含む構造で基板上に複数の生体関連物質が固定配置されているバイオチップそのものを包含する。

【0054】

さらに、本発明は、上記、光によって切断される部分構造を含む構造で基板上

に複数の生体関連物質が固定配置されているバイオチップと該生体関連物質と相互作用可能な物質を、該相互作用可能な条件においた後、該生体関連物質と、該生体関連物質と相互作用可能な物質を同時にMALDI-TOF MS法によって解析することをもって更なる特長とする。この場合、相互作用とは、核酸におけるハイブリッド形成、抗体と抗原の作用、レセプターとリガンドとの作用等を指す。

【0055】

本発明では分析時に照射される光が上記MALDI-TOF MS法の分析時に使用されるレーザー光、すなわち、一般的には波長337nmの窒素レーザー光であれば、分析時にMALDI-TOF MS装置内で、レーザー照射による切断と、脱着／イオン化が同時に起きるので望ましい形態といえる。本法で用いられる他のレーザーの例としては、Nd:YAGレーザーの波長532nm第二高調波をあげることができる。従来例として酸性で分断される結合を利用する際の問題点として、核酸がデピュリネーションにより切断される点をあげたが、核酸は紫外線(250~270nm)を吸収して、場合によって、チミン二量体を形成して、所望の相互作用を生起しないことがあるが、上記のレーザーの波長範囲では、そのような障害がなく望ましいといえる。

【0056】

本発明が対象とする基板に固定化されている物質は特に限定されるものではないが、基板が、いわゆる、バイオチップであれば、DNA、RNA、PNA等の核酸、もしくは、核酸アナログを本発明の範疇とすることができる。

【0057】

また、本発明の、光によって切断される部分構造がに關していえば、これも、限定されることはないが、一般的に光開裂を起こす構造として知られる、ニトロベンゼン含む構造を例としてあげることができる。ニトロベンゼンを含む構造は、一般的に350~400nmの光によって開裂することが知られているので、上記の窒素レーザーを光源として好適に用いることができる。

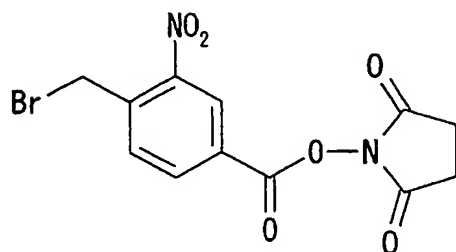
【0058】

ニトロベンゼンを含む構造は下記の化合物I、もしくは、一般式IIで示される

化合物を用いて構築することが可能である。

【0059】

【化25】

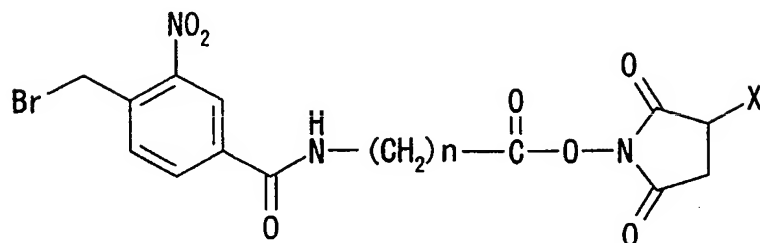


【0060】

化合物I

【0061】

【化26】



【0062】

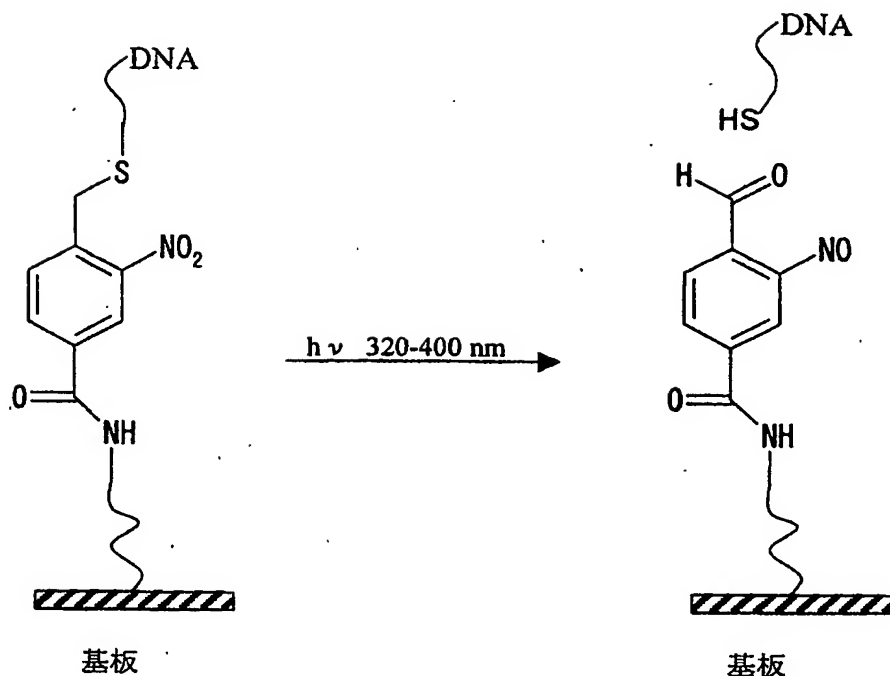
一般式II

(式中、 $n = 3$ 、または、 4 、 $X = H$ 、または、 SO_3Na である)

その際、基板に所望の物質を固定する方法としては、基板として、表面に1級アミノ基が形成されたガラス基板を用いて、物質の一端にスルファニル (SH) 基が結合されており、該アミノ基と、該スルファニル基の結合が、化合物I、あるいは、一般式IIで示される化合物を介して、すなわち、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応、及び、スルファニル基とこれら化合物のブロムベンジル部位との反応によって行われる方法を採用することができる。この場合、ガラス基板への1級アミノ基の形成が、1級アミノ基を有するシランカップリング剤を用いて行うことができる。

【0063】

【化27】



【0064】

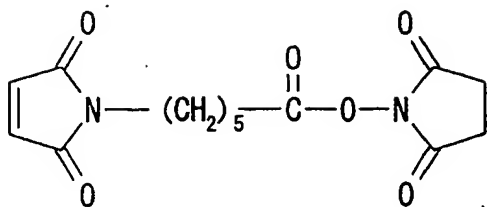
上記の方法で、構築された基板に結合する核酸の構造の一例を、上の化学式（左）に示す。また、光照射によって切断された構造の例を、同じく、上の化学式（右）に示す（Biochemistry International Vol. 26 No. 5, 1992）。例示するように、切断された後の核酸の切断された部位の構造は、切断される前の構造と同じであることがわかる。すなわち、開裂後のDNAは結合前の状態に戻ることとなり、質量も結合前と同じである。

【0065】

特開平11-187900号公報には、1級アミノ基が形成された基板に、スルファニル基を有する核酸との結合に、下記の化学式IVで示す、N-(6-マレイミドカプロイルオキシ)スクシイミドを用いる例の記載があるが、本発明では、この化合物を、化合物I、あるいは、一般式IIで示される化合物に替えるだけで、脱着と、MALDI-TOF MS法による分析が可能となる。

【0066】

【化28】



【0067】

化合物IV

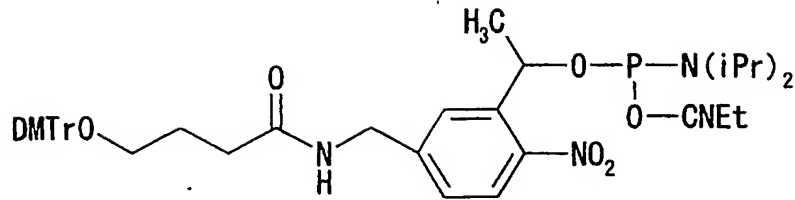
また、基板を作製する他の方法としては、基板として、表面にスルファニル基が形成されたガラス基板を用いて、物質の一端にアミノ基が結合されており、該スルファニル基と、該アミノ基の結合が、化合物I、あるいは、一般式IIで示される化合物を介して、すなわち、スルファニル基とこれら化合物の部プロムベンジル部位との反応、及び、アミノ基とこれら化合物のスクシイミドエステル部位との反応によって行われる方法を例としてあげることができる。この際は、ガラス基板へのスルファニル基の形成が、スルファニル基を有するシランカップリング剤を用いることができる。

【0068】

ニトロベンゼンを含む構造は、下記の化合物IIIで構築することも可能であるが、この方法は、特に核酸を基板に結合する際に有効で、プローブ核酸を核酸自動合成機で合成する際に、例えば、核酸の3'末端、または、5'末端に基板に結合させるべき官能基を有するユニットを導入する直前に、化合物IIIにより、光開裂が可能な構造を導入することができる。この場合、基板に結合させるべき官能基としては、アミノ基、スルファニル基を例としてあげることができ、そのような官能基を核酸自動合成機中で導入する試薬は、例えば、グレンリサーチ社から販売されているので、それらを適宜利用すればよい。また、基板側の処理は、既述のシランカップリング剤を利用した方法を、この場合でも採用可能である。

【0069】

【化29】



【0070】

化合物III

(式中、DMTrOは、ジメトキシトリチルオキシ基、CNEtは、2-シアノエチル基を表す。)

さて、MALDI-TOF MS法では、先に述べたように測定したい物質（被検物質）を脱離、及び、イオン化させるためにマトリクスという物質を被検物質と共存させるが、その方法としてよく行われる方法は、マトリクスの飽和溶液に被検物質を適当な濃度で溶解し、この共存溶液の、例えば、数 μ lを、適宜アドレスが施されたステンレスプレートに滴下、乾燥させ、マトリクスの結晶内に被検物質が適当な濃度で共存している状態とする。この場合、マトリクスの結晶状態、三次元形態、被検物質の濃度によっては、スペクトルが得られなかったり、得られたとしても、S/N比、精度が良好でない場合がある。また、マトリクスの結晶の表面に微小ではあれ、凹凸、傾斜がある場合には、マトリクス中に被検物質が存在するために、場合によっては飛行時間に影響を与える結果、マススペクトルのマス精度に悪影響を与えることがある。

【0071】

本発明では、被検物質は平滑な基板に固定化されているので、飛行時間に影響を与えるおそれは比較的小さい。また、被検物質に対するマトリクス物質の供給も、場合により、基板に対してマトリクスを薄膜状にコーティングすることにより、均一に行うことができ、また、マトリクスの結晶状態も良好となるために、良好なマス精度を得ることが可能となる。上記、マトリクス物質のコーティングは、ディッピング、スピンコーティング法等を適宜利用することができる。また

、コーティングの厚さに関しては、厚すぎるとマトリクス物質の層内部に被検物質が埋め込まれた状態となるために、被検物質の基板表面からの切断、脱離、イオン化が良好に行われない場合があり、また、薄すぎると被検物質がマトリクスから顔を出した状態となり、やはり、基板表面からの切断、脱離、イオン化が良好に行われない場合があるので、被検物質の切断、脱離、イオン化に必要、且つ、十分な厚さにする必要がある。この場合、上記、被検物質の切断、脱離、イオン化に必要、且つ、十分なマトリクス物質のコーティングの厚さは、被検物質が存在する基板からの高さと同程度から千倍程度が好適であるが、もちろん、この厚さに限定されるものではない。

【0072】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。

【0073】

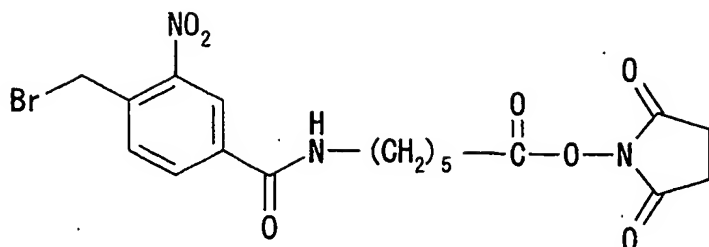
(実施例1)

d T 4 0 プローブによる核酸結合基板の作製と、MALDI-TOF MS法による分析

特開平11-187900号公報に記載の方法に準じて、核酸プローブが一樣に結合した基板を作製した。前記公開公報に記載の方法と異なる点は、核酸プライマーの固定に利用する二官能性架橋剤を、N-(6-マレイミドカプロイルオキシ)スクシイミド(化合物IV)から、一般式IIで示される化合物のひとつである下記化合物V、すなわち、スクシイミジル6-(4-プロモメチル-3-ニトロベンゾイル)アミノヘキサノエートに変更したことと、基板上に、マトリクス状ではなく、一樣に核酸プローブを結合させている点である。

【0074】

【化30】



【0075】

化合物V

(1) 基板洗浄

25.4 mm × 25.4 mm × 1 mmの合成石英基板をラックに入れ、純水で10%に希釈した超音波洗浄用洗剤（ブランソン：GP III）に一晩浸した。その

後、洗剤中で20分間超音波洗浄を行い、その後、水洗により洗剤を除去した。純水ですすいだ後、純水の入った容器中でさらに超音波処理を20分間行った。次に、予め80℃に加温した1N水酸化ナトリウム水溶液に基板を10分間浸した。引き続き水洗、純水洗浄を行って、洗浄済基板をそのまま次の表面処理工程に供した。

【0076】

(2) 表面処理

アミノ基を結合したシランカップリング剤、N-β-(アミノエチル)-γ-アミノプロピルトリメトキシシラン KBM603（信越化学工業）の1wt%水溶液を室温下で2時間攪拌し、上記シラン化合物の分子内のメトキシ基を加水分解した。次いで、この溶液に（1）で得た洗浄済基板を室温で1時間浸漬した後、純水で洗浄し、窒素ガスを基板の両面に吹き付けて乾燥させた。次に基板を120℃に加熱したオーブン中で1時間ベークして最終的に基板表面にアミノ基を導入した。

【0077】

次いで、化合物V（同仁化学研究所）5mgを、ジメチルスルホキシド（DM

SO) / エタノールの 1 : 1 (容量比) 混合溶媒に濃度が 0.5 mg/ml となる様に溶解した。シランカップリング処理を行った石英基板を、この化合物 V の溶液に室温で 2 時間浸漬して、シランカップリング処理によって基板表面に担持されているアミノ基と化合物 V のスクシイミド基を反応させた。この段階で基板表面に化合物 V 由来のプロモエチル基が存在することになる。化合物 V の溶液から引き上げた基板は、DMSO / エタノール混合溶媒、及びエタノールで順次洗浄した後、窒素ガスを吹き付けて乾燥させた。

(3) プローブ DNA の合成

DNA 合成業者 (ベックス) に依頼して、配列番号 1 の一本鎖核酸 (dT の 40 量体) を合成した。なお、配列番号 1 の一本鎖 DNA の 5' 末端には、合成時にチオールモディファイア (グレンリサーチ) を用いることによって、スルファニル (SH) 基を導入した。なお、脱保護、DNA の回収は定法により行い、また、精製には HPLC を用いた。合成から精製までの一連の工程は、全て合成業者に依頼して行った。また、配列番号 1 の核酸の分子量計算値は、12302.17 Da である。

配列番号: 1

5' HS-(CH₂)₆-O-PO₂-O-TTTTTTTTTTTT TTTTTT
TTTTTT TTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTT 3'

(4) DNA の基板への結合

(3) に記載の配列番号 1 の一本鎖 DNA を、8 μ M の濃度で、グリセリン 7.5 wt %、尿素 7.5 wt %、チオジグリコール 7.5 wt %、アセチレノール (商品名: アセチレノール EH; 川研ファインケミカル (株) 社製) 1 wt % を含む溶液に溶解した。

【0078】

次に、上記 DNA 溶液 25 μ l を、(2) で表面処理したガラス基板にのせ、18 mm \times 18 mm のカバーガラスで覆い、ガラス板表面のプロモエチル基と核

酸プローブ末端のスルファニル基とを室温で反応させた。30分後、基板を純水で洗浄し、純水中で保存した。

【0079】

(5) MALDI-TOF MS法による分析

(4) で作製した核酸チップに窒素ガスを吹き付けて水を除去した後、イオン交換樹脂AG 50W-X8 (BIO-RAD) の適当量を100 μ lに分散して、該チップ表面の分析対象部分を含む領域にのせ、5分間、室温に放置して脱塩処理を行った。

【0080】

次いで、純水で洗浄して、イオン交換樹脂を除去し、窒素ガスで水を除去し、真空デシケーターで乾燥した。この乾燥済核酸チップについて、以下の条件でMALDI-TOF MS法による分析を行った。なお、分析時、基板はMALDI-TOF MS分析用のステンレスプレート (日本ブルカー・ダルトニクス) に、ステンレスピンとステンレス製の基板押さえを用いて固定した。

装置名: autoflex Reflectron (日本ブルカー・ダルトニクス)

レーザー: 窒素レーザー

加速電圧: 20KV

測定モード: リニアモード

イオン化: ポジティブ

内部標準: オリゴヌクレオチド; 6117、9191Da

仕様マトリクス: 3-ヒドロキシ-2-プロピオン酸 (3-HPA)

(6) 分析結果

分子量12300.76Daにメインのピークが観測された。理論分子量12302.17Daとの差は、用いた内部標準と実際に分析したDNAの分子量差が大きかったためと考えられる。本実施例の結果より、本発明の方法により、基板上に共有結合で結合している物質の分析に対しても、前記結合部を光によって

切断される部分構造を含む構造に選択することで、MALDI-TOF MS法による分析を応用可能であることがわかる。

(比較例1)

化合物IVによるDNAの結合と、MALDI-TOF MS法による分析の試み。

実施例1において、基板との固定に用いた化合物Vに代えて、光によって切断される部分構造を構成できない、化合物IVを用いる以外は、全く実施例1と同じ手順、条件により、DNA結合基板を作製した。このDNA結合基板に対して、実施例1と全く同じ測定条件を設定し、MALDI-TOF MS法による分析を試みたが、明らかなピークは観察されなかった。

(実施例2)

DNAチップの作製、とMALDI-TOF MS法による分析

(1) DNAチップの作製

基板として、スライドガラス上に黒色テフロン樹脂のウェル（直径2 mm）が30個形成されたテフロンプリント・スライドガラス（ER-212：フナコシ薬品）を用い、実施例1の洗浄前に、UV-オゾン処理を施した後に、実施例1の洗浄、および、表面処理を行った。

配列番号：2

5' HS-(CH₂)₆-O-PO₂-O-ACTGGCCGTCGTTTTC
CA 3'

次に、配列番号2のDNAを実施例1と同様に溶解し、上記表面処理を施したスライドガラスのウェルに4 μlずつ供給し、保湿チャンバー中に室温下30分間放置し、DNAと基板を反応させた。次いで、純水で洗浄し、純水中に保存した。なお、配列2の核酸の分子量計算値は5661.84である。

(2) MALDI-TOF MS法による分析

各ウェルに対するイオン交換樹脂分散液の供給を $4\mu\text{l}$ とする以外は、実施例 1 と同様の方法により、(1) で作製した DNA チップを、MALDI-TOF MS により分析した。なお、分析はウェルの内部にレーザーのスポットを照射して行った。また、使用した内部標準核酸は 3645Da と 6117Da である。

(3) 分析結果

分子量 5662.05Da にメインのピークが観測された。本実施例の結果より、本発明の方法により、基板上に DNA プローブを結合させる際、前記結合部を光によって切断される部分構造を含む構造に選択することで、DNA チップ上に結合された DNA プローブの分析が、MALDI-TOF MS 法により可能となることがわかる。

(実施例 3)

DNA チップ上でのハイブリダイゼーションと、MALDI-TOF MS 法による分析

(1) ハイブリダイゼーション

配列番号: 3

5' TGTA AACGACGGCCAGT 3'

実施例 2 で作製した DNA チップのプローブ核酸の塩基配列 (配列番号: 2) に相補的な上記配列番号: 3 の DNA を合成した。この DNA を、 50pM の濃度で 1M の NaCl を含む 50mM リン酸緩衝液 ($\text{pH}=7.0$) に溶解した。次に、実施例 2 で作製した DNA チップのウェルに、この DNA 溶液を $5\mu\text{l}$ 供給し、カバーガラスで覆いをした後、保湿チャンバー内で 45°C で 15 時間ハイブリダイゼーションを行った。次に、DNA チップを冷純水で 30 秒間洗浄し、

窒素ガスで純水を除去した後、真空デシケーター中で乾燥した。なお、配列番号：3の核酸の分子量計算値は5532.07Daである。

(2) MALDI-TOF MSによる分析

脱塩処理を行わない以外は、実施例2と全く同様の方法により、MALDI-TOF MS法により分析を行った。

(3) 分析結果

分子量5662.05Daと5532.57Daにふたつのピークが観察された。これらは、それぞれ、DNAチップ上に結合された配列番号：2のDNAプローブと、該プローブとハイブリッドを形成した配列番号：3のDNAによるものと考えられた。

【0081】

本実施例の結果より、本発明の方法により、基板上にDNAプローブを結合させる際、前記結合部を光によって切断される部分構造を含む構造に選択することで、DNAチップ上に結合されたDNAプローブと、該DNAプローブとハイブリッドを形成した標的DNAの双方ともに、MALDI-TOF MS法による分析を適用することが可能となることがわかる。

【0082】

【発明の効果】

本発明により、基板上に結合された物質のMALDI-TOF MSによる分析が可能となった。また、同様に、核酸チップ上に結合された核酸プローブ、ならびに、該核酸プローブとハイブリッドを形成した標的核酸のMALDI-TOF MSによる分析が可能となった。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 基板上に結合された物質に対しても、MALDI-TOF MS分析を利用して、かかる物質の特定に利用可能な分子量の測定を可能とする方法を提供する。

【解決手段】 物質を基板上に結合する際、その接合部に、光によって切断される部分構造を設け、所定の光照射によって、かかる光によって切断される部分構造で選択的に切断することで、非固定状態とすることで、MALDI-TOF MS分析を利用可能とする。

【解決手段】

【選択図】 なし

特願 2002-191535

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001007]

1. 変更年月日

1990年 8月30日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

氏 名

キヤノン株式会社